

(19)日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11)特許出願公開番号

特開平5-65233

(43)公開日 平成5年(1993)3月19日

(51)Int.Cl. ⁵	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
A 6 1 K 39/395	M	8413-4C		
9/14	D	7329-4C		
47/12	J	7329-4C		
47/42	J	7329-4C		

審査請求 未請求 請求項の数10(全 8 頁)

(21)出願番号	特願平4-41015	(71)出願人	000003126 三井東圧化学株式会社 東京都千代田区霞が関三丁目2番5号
(22)出願日	平成4年(1992)2月27日	(72)発明者	福田 保 千葉県茂原市東郷1144番地 三井東圧化学 株式会社内
(31)優先権主張番号	特願平3-43431	(72)発明者	島 崎 幸 雄 千葉県茂原市東郷1144番地 三井東圧化学 株式会社内
(32)優先日	平3(1991)3月8日	(72)発明者	黒 岩 保 幸 千葉県茂原市東郷1144番地 三井東圧化学 株式会社内
(33)優先権主張国	日本(JP)		

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 モノクローナル抗体含有凍結乾燥製剤

(57)【要約】

【目的】 モノクローナル抗体の凍結乾燥処理時に生じる変性と、抗原結合活性の低下を防止した、安定なモノクローナル抗体含有凍結乾燥製剤を提供する。

【構成】 モノクローナル抗体とゼラチン、或はモノクローナル抗体とカルボン酸もしくはその塩を含有するモノクローナル抗体溶液を凍結乾燥する。乾燥後該乾燥物に蒸留水を加えてを溶解し、抗原結合活性を測定した。その結果モノクローナル抗体は凍結前の抗原結合活性をよく保持した。

19

【特許請求の範囲】

【請求項1】 モノクローナル抗体及びゼラチンを含有することを特徴とする凍結乾燥製剤。

【請求項2】 モノクローナル抗体及びカルボン酸もしくはその塩を含有するpH6.1～8.1である溶液を凍結乾燥して調製した製剤。

【請求項3】 カルボン酸がクエン酸である請求項2記載の製剤。

【請求項4】 凍結乾燥前の溶液のpHが、4.0～8.1である請求項1記載の製剤。

【請求項5】 モノクローナル抗体がヒト由来である請求項1～4記載のいずれか1項に記載の製剤。

【請求項6】 モノクローナル抗体のグロブリンタイプがIgM型である請求項1～4記載のいずれか1項に記載の製剤。

【請求項7】 ゼラチンが中性ゼラチンあるいは酸性ゼラチンである請求項1あるいは請求項4記載の製剤。

【請求項8】 製剤が、さらにカルボン酸あるいはその塩もしくは無機塩を含有する請求項1あるいは請求項4記載の製剤。

【請求項9】 製剤が、さらに単糖類、二糖類、糖アルコールまたはアミノ酸のうち少なくとも1種を含有する請求項1～4記載のいずれか1項に記載の製剤。

【請求項10】 製剤が、複数のモノクローナル抗体を含む請求項1～4記載のいずれか1項に記載の製剤。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】本発明は、モノクローナル抗体を主成分とする凍結乾燥製剤に関する。

【0002】

【従来の技術】モノクローナル抗体は、特定のエピトープのみに反応性を有する均一なグロブリンタンパク質である。近年、細胞融合、培養、及びタンパク質精製技術等の進歩により、モノクローナル抗体の大量調製が可能となり、例えば、各種分析、診断、治療、予防等、広い分野で利用されるようになった。中でも、治療あるいは予防薬として、モノクローナル抗体への期待が高まっている。とりわけヒトに対する適用は今後更に進展することが予想され、抗原性の点で好ましいヒト由来のモノクローナル抗体の開発が進められている。

【0003】従来、当該分野においては同様な目的のために免疫グロブリンなどのポリクローナルな抗体が診断治療に使用されてきた。モノクローナル抗体が特定のエピトープのみに反応性を有する均一なものであるのに対し、ポリクローナルな抗体はその名の通り複数の抗体の混合物である。そのためポリクローナルな抗体は性質の異なる分子が相互に安定化し合い、全体として比較的安定な状態となっている。しかし、精製されたモノクローナル抗体は異なる分子同志の相互作用による安定化が期待できず、そのグロブリンタイプによらず、種々の物理

的、化学的作用に対して不安定である。

【0004】モノクローナル抗体やポリクローナルな抗体等のグロブリン蛋白は、特に診断及び治療を目的とした場合、混入するウイルスの不活化のために加熱処理が施されることがある。また、該グロブリン蛋白は溶液状態では長期保存には向かない。そのため凍結乾燥が該グロブリン蛋白分子を安定保存するための製剤形態として汎用されている。更に、必要により該グロブリン蛋白は酸・アルカリ処理なども行われる。

10 【0005】これらの加熱、凍結乾燥、酸・アルカリ処理に対して、ポリクローナルな抗体は一般に安定であるのに対し、モノクローナル抗体はそれらの処理等により変性し、その活性を失い易い。とりわけIgMは他のグロブリンタイプのモノクローナル抗体（例えばIgG、IgA、IgE）に比べてより不安定である。加熱処理については例えば特開昭61-76423にはモノクローナル抗体が加熱処理に対して不安定であり、この熱的不安定性を克服するためにモノクローナル抗体製剤中に卵アルブミン加水分解物を添加する事を開示している。一方、凍結乾燥処理においてはモノクローナル抗体に特有な問題点がある。即ちモノクローナル抗体を凍結乾燥するに際して、モノクローナル抗体溶液を安定化剤を添加せずに凍結乾燥した場合、その処理中に生じる変性により抗原結合活性が低下するという問題が生じ、これを防止することが必要である。このような問題点はモノクローナル抗体において顕著であり、ポリクローナルな抗体の場合は上記の理由からもと安定であり、大きな問題とはならない。モノクローナル抗体の凍結乾燥物の調製には、凍結乾燥前の溶液に異種タンパク質であるアルブミンを添加したり（例えば特開昭60-146833、特開昭61-78730、特開昭61-78731、W0 90/11091）、糖質であるマルトースを添加すること（例えばW0 89/11297）が既に公知である。

【0006】ポリクローナルな抗体である免疫グロブリンは、比較的高濃度で用いられることが多く、溶液保存あるいはそれに続く凍結乾燥処理時に凝集体が生成することがある。この凝集体は該グロブリンを静注した場合に見られるアナフィラキシー様の重篤な副作用の原因と考えられている。そこで凝集体の形成を抑えるために保存溶液に異種タンパク質を加えることが知られている。例えば、異種タンパク質であるゼラチンを単独で免疫グロブリン溶液に添加したり（例えば特開昭58-167518、Vox. Sang. (1983) 51, 81-86）、あるいは糖質であるシュークロースとゼラチンを併用して添加すると、保存中の凝集体形成が防止され、更に抗菌、抗ウイルス作用が保持されることが知られている（SU 700132）。これらに開示されていることはポリクローナルな抗体である免疫グロブリンを高濃度溶液中とした場合の凝集体形成の防止を目的としている。そしてこれらの何れにも凍結乾燥処理による抗原結合活性の低下に関しては論じられていな

い。これに対して、モノクローナル抗体は比較的低濃度で保存ないし凍結乾燥される。そしてそのような低濃度であっても凍結乾燥処理時に生じる変性とそれに伴う抗原結合活性の低下が問題となる。そしてこの問題の解決にゼラチン添加（免疫グロブリンにおける凝集体形成の防止のためは有用であった）が有用であるか否かについては従来知られていなかった。

【0007】他方、カルボン酸及びその塩が、多くのタンパク質溶液のpH維持のための緩衝液の成分として使用されることは広く知られている。例えばW089/11298では、モノクローナル抗体保存溶液に沈澱する凝集体形成の防止のため、安定化剤としてマルトース、食塩、リン酸ナトリウムを添加することが開示されているが、その際緩衝液成分としてリン酸ナトリウムの他にクエン酸ナトリウムも使用することが例示されている。しかし、これはモノクローナル抗体溶液の保存中に生じる凝集体形成を防止することについて示されるもので、モノクローナル抗体の凍結乾燥処理さらには該処理時のモノクローナル抗体の変性とそれに伴う抗原結合活性の低下の防止については何も開示していない。また、W089/11297では、凍結乾燥前のモノクローナルIgG抗体溶液にマルトースを安定化剤として添加し、更に酢酸ナトリウムを緩衝液の成分として5～10ミリモルの濃度に添加して、該溶液のpHを3～6の酸性領域に維持することが開示されている。この場合、酢酸ナトリウムの使用は明らかに緩衝液の成分としてのものであり、W089/11297にはカルボン酸及びその塩がpH緩衝作用を示す範囲を超えたpHにおいても凍結乾燥処理時の抗体の変性を防止するための安定化剤として作用することについては何ら示されていない。また、該抗体溶液のpHについては注射剤として低いpHの抗体溶液を静注した場合、投与部位に傷みを生ずる場合がある。該抗体溶液を注射剤として用いる場合、中性付近のpH範囲が望ましいが、このpH範囲での利用についてもW089/11297には示されていない。

【0008】また、免疫グロブリンを血清や血漿から調製する際に混入する恐れのあるウイルスの不活化を目的として、免疫グロブリンを溶液状態で加熱処理することがある。例えば特開昭62-292731、特開昭61-194035、特開昭61-191622あるいは特開昭57-140724では、カルボン酸を該グロブリン溶液に添加することが示されている。また、特開昭61-78730及び特開昭61-78731では、免疫グロブリンを乾燥状態で加熱処理する際に酢酸ナトリウムを添加することが示されている。しかし、これらはいずれも加熱処理の際の安定化を目的としてカルボン酸を添加しているに過ぎない。即ち凍結乾燥処理時の抗体の変性とそれに伴う抗原結合活性を防止するためにカルボン酸及びその塩が有用であるか否かについてはこれまで知られていなかった。

【0009】

【発明が解決しようとする課題】本発明の目的は、モノクローナル抗体の凍結乾燥処理時に生じる変性と、それに伴う抗原結合活性の低下を防止した、安定なモノクローナル抗体凍結乾燥製剤を提供することにある。

【0010】

【課題を解決するための手段】本発明者らは、上記課題を解決するために鋭意検討を行った結果、モノクローナル抗体の凍結乾燥処理においてモノクローナル抗体の安定化のためにゼラチン、カルボン酸もしくはその塩が有効であることを見いだした。すなわち、凍結乾燥前のモノクローナル抗体を含む溶液がゼラチンを含有することにより、凍結乾燥処理時に生じるモノクローナル抗体の変性と、それに伴う抗原結合活性の活性の低下を防止出来ること。また凍結乾燥前のモノクローナル抗体を含む溶液がカルボン酸もしくはその塩を含有することにより、広い範囲のpH領域で、しかも緩衝作用を示す範囲外のpHにおいても凍結乾燥処理時に生じるモノクローナル抗体の変性と、それに伴う抗原結合活性の低下を防止出来、これによりモノクローナル抗体の安定かつ安全性の高い製剤組成物の作製が可能であることを見だし、本発明を完成するに至った。

【0011】即ち、本発明はモノクローナル抗体及びゼラチンを含有することを特徴とする凍結乾燥製剤及びモノクローナル抗体及びカルボン酸もしくはその塩を含有するpH6.1～8.1である溶液を凍結乾燥して調製した製剤を提供するものである。

【0012】以下、本発明を具体的に説明する。本発明に使用されるモノクローナル抗体としては、ヒト、マウス、ラット等から通常得られるモノクローナル抗体であり、その由来や生産手段を問わない。例えば従来報告されている細胞融合法や形質転換法等の方法により作製した抗体産生細胞や、クローニングした抗体遺伝子を組み込んだ細胞を培養して得た培養液、あるいはこのような抗体産生細胞を移植したマウスの腹水等から、本発明に使用されるモノクローナル抗体を得ることができる。これらの細胞培養液あるいはマウスの腹水等から得られるモノクローナル抗体の精製方法としては、硫酸アンモニウム塩析、イオン交換クロマトグラフィー、ゲル濾過、アフィニティクロマトグラフィー、超遠心分離、吸着クロマトグラフィー、疎水性クロマトグラフィー等の方法が使用できる。本発明に使用されるモノクローナル抗体のグロブリンタイプは、IgG、IgM、IgA及びIgEであることが多いが、特にそのタイプは問わず、いずれのグロブリンタイプのものも使用できる。その中でも特にIgMは、他のグロブリンタイプの抗体に比べてより不安定なため、IgM型のモノクローナル抗体において有効な安定化の方法は、他のグロブリンタイプのモノクローナル抗体にも容易に適用される。また、本発明において、モノクローナル抗体は単独で用いてもよいし、複数のモノクローナル抗体を混合して用いても差し

支えない。

【0013】ゼラチンは、その調製方法により等電点の異なる二つのタイプ（中性タイプと酸性タイプ）が得られるが、本発明に用いるのはそのいずれでも良く、更にオキシポリゼラチン、変性液状ゼラチン等の化学的修飾を受けたゼラチンも使用可能である。

【0014】カルボン酸としては、クエン酸、酢酸、シュウ酸、コハク酸、フマル酸等が使用できるが、クエン酸が好ましい。また、カルボン酸の塩としては、クエン酸ナトリウム、クエン酸カリウム、酢酸ナトリウム、酢酸カリウム、シュウ酸ナトリウム、シュウ酸カリウム、コハク酸ナトリウム、コハク酸カリウム、フマル酸ナトリウム、フマル酸カリウム等が使用できるが、クエン酸ナトリウムが好ましい。

【0015】また、モノクローナル抗体の安定化、または溶液のpH調整、等張化及び緩衝作用を目的として、ゼラチン、カルボン酸あるいはその塩に加え、更に無機塩、単糖類、二糖類、糖アルコールもしくはアミノ酸を添加することも可能である。無機塩は、塩化ナトリウム、塩化カリウム、塩化マグネシウム等が使用できるが、塩化ナトリウムが好ましい。単糖類は、グルコース、マンノース、ガラクトース、フルクトース等が使用できるが、グルコースあるいはマンノースが好ましい。二糖類は、マルトース、シュクロース、ラクトース等が使用できるが、マルトースあるいはシュクロースが好ましい。糖アルコールは、ソルビトール、マンニトール等が使用できるが、マンニトールが好ましい。アミノ酸は、グリシン、アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、チロシン、フェニルアラニン、セリン、スレオニン、グルタミン、グルタミン酸、アスパラギン、アスパラギン酸、アルギニン、リジン、ヒスチジン、プロリン、トリプトファン、メチオニン、システイン等が使用できるが、グリシンあるいはアルギニンが好ましい。

【0016】本発明の凍結乾燥製剤を作製するには、ゼラチン、カルボン酸もしくはその塩を含有するモノクローナル抗体溶液を凍結乾燥すれば良い。好ましくは、ゼラチン、カルボン酸もしくはその塩を含有し、pHの調整された緩衝液にモノクローナル抗体溶液を添加すること、あるいはモノクローナル抗体溶液にゼラチン、カルボン酸もしくはその塩を添加すること等により行うことができる。本発明で用いられるモノクローナル抗体の溶液中での濃度は、0.01mg/mlから50mg/mlであり、好ましくは、0.1mg/mlから10mg/mlである。ゼラチンの添加量は、モノクローナル抗体1重量部に対し100分の1重量部から100重量部であり、好ましくはモノクローナル抗体1重量部に対し10分の1重量部から10重量部である。添加されるカルボン酸もしくはその塩の濃度は2mMから500mMであり、好ましくは10mMから200mMである。

【0017】モノクローナル抗体を溶解する溶液のpH

は、ゼラチンを添加する場合はpH4.0～8.1であり、カルボン酸を添加する場合、及びゼラチンとカルボン酸の両方を添加する場合はpH6.1～8.1であり、好ましくはpH6.5～7.8である。pHの調整は、通常用いられる有機酸や無機酸、無機塩等の化合物を単独或は組み合わせて使用することが出来る。pH調整に使用できる化合物としては例えば、クエン酸、クエン酸ナトリウム、クエン酸カリウム、リン酸、リン酸ナトリウム、リン酸カリウム、塩酸、トリスヒドロキシメチルアミノメタン、酢酸、酢酸ナトリウム、酢酸カリウム、水酸化ナトリウム、ホウ酸、ホウ酸ナトリウム、ホウ酸カリウム等が例示できる。モノクローナル抗体を溶解する緩衝液の濃度は5mMから500mMであり、好ましくは10mMから500mMである。このように、カルボン酸もしくはその塩はpH調整に際しても使用され得るが、上記の量はこれらも含む全量を意味する。

【0018】この様にして調製されたモノクローナル抗体溶液は、このまま凍結し凍結乾燥しても十分安定であるが、溶液の等張化やモノクローナル抗体の容器付着性等を防止する目的で、ツイーン20やツイーン80等の界面活性剤、ヒトや牛等のアルブミン、あるいはEDTA等のキレート剤等を添加することも可能である。モノクローナル抗体溶液の凍結乾燥は、通常知られる方法で行うことができ、その乾燥温度、真空度は適宜選択できる。

【0019】

【実施例】以下、実施例を示して本発明を説明するが、本発明はこれに限定されるものではない。また、本発明ではモノクローナル抗体としてIgMを例示しているが、IgMは上述したごとく他のグロブリンタイプの抗体（例えばIgG、IgA及びIgE）に比べて不安定であり、IgMで示される安定化効果は、他のグロブリンタイプの抗体に容易に適用できるものである。

【0020】本願における抗緑膿菌抗体の抗原結合活性の測定法は以下の通りである。

（抗原結合活性測定法）E血清型緑膿菌（*Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27581）ホルマリン死菌体より田辺ら（免疫実験操作法C、(1978)1793-1801）の方法により、調製したリポ多糖（LPS）をリン酸緩衝化生理食塩液（以下PBSと称する）に1mg/ml濃度となる様に溶解し、これを0.1Mリン酸緩衝液（pH7.0）で500倍に希釈した後、96穴EIAプレート（グライナー社、イミュロン-600）の各ウエルに50μlずつ分注した。4℃に一晩放置して固定化した後、0.05%Tween20を含むPBS（以下洗浄液と略す）で洗浄し、0.5%牛血清アルブミンを含むPBS（以下ブロック液と略す）を各ウエル当り200μlずつ分注し、室温で1時間振とうして非特異的タンパク質結合部位を飽和させた。ブロック液を除去した後、適当な濃度から順次倍々希釈した被検体溶液をウエル当り100

μ1ずつ入れ、室温で2時間振とうした。洗浄液で4回洗浄した後、ブロック液で1000倍に希釈したパーオキシダーゼ標識ヤギ抗ヒトIgM抗体(タゴ社)をウエル当り100μ1ずつ分注し、室温で2時間振とうした。洗浄液で4回洗浄した後、0.1Mクエン酸緩衝液(pH4.0)で1回洗浄し、1mg/ml 2, 2'-アジノビス(3-エチルベンズチアゾリン-6-スルフォニックアシド)及び0.003%過酸化水素水を同緩衝液に含む基質溶液をウエル当り50μ1ずつ分注し、室温で振とうした。30分後、2%コハク酸をウエル当り50μ1ずつ加えて酵素反応を停止させた後、414nmにおける吸光度を96穴プレートリーダー(日本インターメッド社)にて測定した。希釈倍率の逆数と吸光度の間で両対数プロットを行い、吸光度0.1を示すときの希釈倍率を求め、これを抗原結合活性とした。

【0021】実施例1

E血清型緑膿菌に反応性を有するエプスタイン・バー・ウイルス(EBウイルス)形質転換細胞株MP-5038(微工研条寄第1596号)を培養し、その培養上清から硫酸アンモニウム塩析、セファクリルS-300(ファルマシア社)を用いたゲル濾過、ヒドロキシアパタイトHPLCカラム(三井東圧化学)及びブルーセファロース(ファルマシア社)を用いたカラムクロマトグラフィーにより、ヒト・モノクローナル抗体を精製した。この方法で得られたモノクローナル抗体は、SDS-電気泳動及びゲル濾過カラムを用いたHPLCによる分析で、99%以上の純度を有していた。このモノクローナル抗体を終濃度として0.1mg/mlとなる様にpH4.7に調整されたPBSに溶解した。一方、ゼラチン(ニッピ社、ハイグレードゼラチン、タイプA(中性ゼラチン)及びタイプB(酸性ゼラチン))を終濃度として0.001から1%となる様に加え、2ml容量のポリプロピレン製クライオチューブ(コーニング社)に0.5mlずつ無菌的に分注し、-80℃にて凍結させた。これを真空減圧下凍結乾燥した。乾燥後、凍結前と等量の注射用蒸留水を凍結乾燥物に加えて溶解後、以下の方法によりモノクローナル抗体の抗原結合活性を測

定した。凍結前の抗原結合活性を10とした相対活性で、結果を表1(表1)に示した。ゼラチンを添加せずにモノクローナル抗体を凍結乾燥した場合、抗原結合活性は大きく減少した。これに対して、ゼラチンを添加した場合、凍結乾燥後においても抗原結合活性が良く回収され、その効果は添加したゼラチンの濃度に依存した。

【0022】

【表1】

ゼラチン濃度 (%)	抗原結合活性	
	中性ゼラチン	酸性ゼラチン
0	2	2
0.001	4	3
0.003	6	6
0.01	10	8
0.03	10	10
0.1	10	10
1	10	10

【0023】実施例2

実施例1に用いたモノクローナル抗体を終濃度として0.1mg/mlとなる様に各pHの緩衝液に溶解した。一方、中性ゼラチンを終濃度として0.01%となる様に加え、ポリプロピレン製クライオチューブに0.5mlずつ無菌的に分注し、-80℃にて凍結させ、真空減圧下凍結乾燥した。凍結前と等容量の注射用蒸留水を凍結乾燥物に加えて溶解後、抗原結合活性を測定した。凍結前の活性を10とした相対活性で、結果を表2(表2)に示した。いずれのpHにおいても抗原結合活性は良く回収された。

【0024】

【表2】

緩衝液(0.2M)	pH	ゼラチン濃度(%)	抗原結合活性
クエン酸ナトリウム	4.0	0.01	10
	5.0	0.01	10
	6.0	0.01	10
リン酸ナトリウム	6.2	0.01	10
	7.0	0.01	10
	8.1	0.01	10

【0025】実施例3

クエン酸ナトリウムを含まないかあるいは2または10mM含有し、pH7に調整された20mMリン酸緩衝液

に、実施例1で用いたモノクローナル抗体を終濃度として0.1mg/mlとなるように溶解した。この際、溶液の塩濃度を塩化ナトリウムで150mMに調整した。

このモノクローナル抗体溶液を、ポリプロピレン製クライオチューブに0.5mlずつ無菌的に分注し、-80℃にて凍結し、真空減圧下凍結乾燥した。凍結前と等量の注射用蒸留水を凍結乾燥物に加えて溶解後、抗原結合活性を測定した。凍結前の活性を10とした相対活性で、結果を表3(表3)に示した。クエン酸ナトリウムを含有せずにモノクローナル抗体を凍結乾燥した場合、

クエン酸ナトリウム濃度 (mM)	0	2	10
抗原結合活性	2	5	9

【0027】実施例4

クエン酸ナトリウムを10mMから200mMの濃度に含有し、pH6.1~8.1に調整された50mMリン酸緩衝液に、実施例1で用いたモノクローナル抗体を、終濃度として0.1mg/mlとなるように溶解した。この際、溶液の塩濃度が150mMに満たない場合、塩化ナトリウムを添加して150mMとした。このモノクローナル抗体溶液を、ポリプロピレン製クライオチューブに0.5mlずつ無菌的に分注し、-80℃にて凍結し、真空減圧下凍結乾燥した。凍結前と等量の注射用蒸留水を凍結乾燥物に加えて溶解後、抗原結合活性を測定した。凍結前の活性を10とした相対活性で、結果を表4(表4)に示した。pH6.1~8.1でクエン酸ナトリウムを含有することにより、凍結乾燥後も抗原結合活性が良く回収された。

【0028】

【表4】

溶液の pH	抗原結合活性			
	クエン酸ナトリウム濃度 (mM)			
	10	50	100	200
6.1	10	10	10	10
7.0	9	10	10	10
8.1	9	10	10	-

【0029】実施例5

40

ゼラチン濃度 (%)	低分子物質濃度 (%)	抗原結合活性				
		グルコース	シュークロース	マンニトール	グリシン	アルギニン
0.003	0.001	7	7	7	8	7
0.003	0.003	8	8	7	8	8
0.003	0.01	8	6	8	10	8
0.003	0.03	8	8	8	10	8

抗原結合活性は大きく減少した。これに対して、クエン酸ナトリウムを含有した場合、凍結乾燥後においても抗原結合活性が良く回収され、その効果は含まれるクエン酸ナトリウムの濃度に依存した。

【0026】

【表3】

実施例1で使用したモノクローナル抗体を終濃度として0.1mg/mlとなる様にPBSに溶解した。一方、中性ゼラチンを終濃度として0.003%となる様に加え、更にグルコース、シュークロース、マンニトール、グリシン、あるいはアルギニンをそれぞれ終濃度として0.001から0.1%なる様に加え、ポリプロピレン製クライオチューブに0.5mlずつ無菌的に分注し、-80℃にて凍結させた。これを真空減圧下凍結乾燥した。凍結前と等容量の注射用蒸留水を凍結乾燥物に加えて溶解後、抗原結合活性を測定した。凍結乾燥前の活性を10とした相対活性で、結果を表5(表5)に示した。いずれの低分子化合物においても抗体活性が良く回収され、その効果は添加した低分子化合物の濃度に依存した。

【0030】

【表5】

11						12
0.003	0.1	8	10	8	10	8
0.003	0	6	6	6	6	6

【0031】実施例6

実施例1で用いたモノクローナル抗体を終濃度として0.1mg/mlとなる様にPBSに溶解した。一方、中性ゼラチンを終濃度として0.003%となる様に加え、更にマンニトールを終濃度として0.5あるいは1%となる様に加えた。ポリプロピレン製クライオチューブに0.5mlずつ無菌的に分注し、-80℃にて凍結させた。これを真空減圧下凍結乾燥した。凍結前と等容

量の注射用蒸留水を凍結乾燥物に加えて溶解後、抗原結合活性を測定した。凍結乾燥前の活性を10とした相対活性で、結果を表6(表6)に示したが、いずれのマンニトール濃度においても抗原結合活性が良く回収された。

【0032】

【表6】

マンニトール濃度 (%)	0.5	1.0
抗原結合活性	10	10

【0033】実施例7

実施例1で使用したモノクローナル抗体を、1mg/mlの濃度となるように、中性ゼラチン(0.01%)、クエン酸ナトリウム(0.02M)、マンニトール(0.5%)及び塩化ナトリウム(0.05M)を含む0.1Mリン酸緩衝液(pH7.0)に溶解した。このモノクローナル抗体溶液を、10ml容量のガラス製バイアル(岩城ガラス社)に1mlずつ無菌的に分注し、-80℃にて凍結し、真空減圧下凍結乾燥した。凍結前と等容量の注射用蒸留水を凍結乾燥物に加えて溶解後、抗原結合活性を測定した。その結果、モノクローナル抗体は、凍結前の抗原結合活性を保持していた。

【0034】実施例8

実施例1で用いたモノクローナル抗体を、1mg/mlの濃度となるように、クエン酸ナトリウム(0.02M)、塩化ナトリウム(0.05M)、マンニトール(0.5%)を含む0.1Mリン酸緩衝液(pH7.0)に溶解した。このモノクローナル抗体溶液をガラス製バイアルに分注し、-80℃にて凍結後、真空減圧下凍結乾燥した。凍結前と等容量の注射用蒸留水を凍結乾燥物に加えて溶解後、実施例1に従って抗原結合活性を測定した。その結果、モノクローナル抗体は、凍結前の抗原結合活性を保持していた。

【0035】実施例9

細胞融合法により作製し、A血清型緑膿菌に対して反応性を有するヒトIgMを産生するヒト・ヒトハイブリドーマMP5121(微工研条寄2270号)を培養し、その培養上清から実施例1に従って、モノクローナル抗体を精製した。このモノクローナル抗体を1mg/mlの濃度となるように、クエン酸ナトリウム(0.02M)、塩化ナトリウム(0.05M)、マンニトール(0.5%)を含む0.1Mリン酸緩衝液(pH7.0)に溶解した。このモノクローナル抗体溶液をガラス製バイアルに分注し、-80℃にて凍結後、真空減圧下

凍結乾燥した。凍結前と等量の注射用蒸留水を凍結乾燥物に加えて溶解後、実施例1に従って抗原結合活性を測定した。なお、抗原のLPSは、A血清型緑膿菌(ATCC 27577)から抽出した。その結果、モノクローナル抗体は、凍結前の抗原結合活性を保持していた。

【0036】実施例10

細胞融合法により作製したヒトIgM産生ヒト・ヒトハイブリドーマMP5097、MP5139、MP5114及びMP5156(それぞれ微工研条寄2268号、2272号、2269号及び2339号)の培養上清からモノクローナル抗体を精製した。これらモノクローナル抗体は緑膿菌との反応性を有し、それぞれ、B、E、G及びI血清型菌に反応性を持っていた。これら4種のモノクローナル抗体と実施例9で示したモノクローナル抗体の合わせて5種類を、それぞれ終濃度として5mg/mlの濃度となるように、クエン酸ナトリウム(0.02M)、塩化ナトリウム(0.05M)、マンニトール(0.5%)を含む0.1Mリン酸緩衝液(pH7.0)に溶解した。このモノクローナル抗体溶液をガラス製バイアルに分注し、-80℃にて凍結後、真空減圧下凍結乾燥した。凍結前と等量の注射用蒸留水を加えて溶解後、実施例1に従って抗原結合活性を測定した。なお、それぞれの抗原は、A血清型はATCC 27577、B血清型はATCC 27578、E血清型はATCC 27581、G血清型はATCC 27584、及びI血清型はATCC 27586から抽出したLPSを用いた。その結果、モノクローナル抗体は、5種類の血清型緑膿菌LPSそれぞれに対して、凍結前の抗原結合活性を保持していた。

【0037】

【発明の効果】本発明に示したゼラチンあるいはカルボン酸及びその塩の添加により、凍結乾燥時の変性を抑え、抗原結合活性を安定に保持したモノクローナル抗体凍結乾燥製剤の供給が可能となった。モノクローナル抗体のグロブリンタイプは、IgG、IgM、IgA及び

13

I g E のいずれの型にも適用可能であり、とりわけ安定性の乏しい I g M に対しても十分適用できる。モノクローナル抗体は、ヒト由来である場合もあり、マウスあるいはラット由来の場合でも本発明を適用できる。また、凍結乾燥製剤中に含まれるモノクローナル抗体は一種の

14

場合もあるが、数種のモノクローナル抗体を含む場合にも適用できる。この発明のモノクローナル抗体凍結乾燥製剤は、免疫グロブリン製剤と同様に免疫補充療法剤として、細菌感染症、ウイルス感染症等に対する予防あるいは治療剤として供給可能である。

フロントページの続き

(72)発明者 高 木 司 郎

千葉県茂原市東郷1144番地 三井東圧化学
株式会社内



Europäisches Patentamt
European Patent Office
Office européen des brevets



Publication number: **0 531 539 A1**

(12)

EUROPEAN PATENT APPLICATION
published in accordance with Art.
158(3) EPC

(21) Application number: **92906211.5**

(51) Int. Cl.⁵: **A61K 39/395**

(22) Date of filing: **28.02.92**

(86) International application number:
PCT/JP92/00226

(87) International publication number:
WO 92/15331 (17.09.92 92/24)

(30) Priority: **08.03.91 JP 43431/91**

(43) Date of publication of application:
17.03.93 Bulletin 93/11

(84) Designated Contracting States:
DE DK ES FR GB IT NL SE

(71) Applicant: **mitsui toatsu chemicals, Inc.**
2-5 Kasumigaseki 3-chome
Chiyoda-Ku Tokyo 100(JP)

(72) Inventor: **FUKUDA, Tamotsu**
2142, Tougou
Mobara-shi, Chiba-ken 297(JP)
Inventor: **SHIMAZAKI, Yukio**
1539-2, Tougou
Mobara-shi, Chiba-ken 297(JP)
Inventor: **KUROIWA, Yasuyuki**
2791-1, Mutuno
Mobara-shi, Chiba-ken 297(JP)
Inventor: **TAKAGI, Shiro**
2141, Tougo
Mobara-shi, Chiba-ken 29(JP)

(74) Representative: **Holdcroft, James Gerald, Dr.**
Graham Watt & Co., Riverhead
Sevenoaks, Kent TN13 2BN (GB)

(54) **LYOPHILIZED MONOCLONAL ANTIBODY PREPARATION.**

(57) A lyophilized monoclonal antibody preparation containing gelatin, carboxylic acid or its salt added thereto in order to suppress the denaturation during lyophilization and to attain a persistent antigen binding activity. It can be supplied, like an immunoglobulin preparation, as an immunotherapeutic agent for preventing or treating infectious diseases caused by bacteria, viruses and so forth.

EP 0 531 539 A1

FIELD OF THE INVENTION

The present invention relates to a freeze-dried preparation comprising a monoclonal antibody(or antibodies) as a main ingredient(s).

PRIOR ART

A monoclonal antibody is a homogeneous globulin protein having reactivity to only a specific epitope. Recent progress in technologies of cell fusion, cultivation and protein purification, etc. has made it possible to produce large amounts of monoclonal antibodies. As a result, monoclonal antibodies have come to be utilized in various fields, such as various analyses, diagnoses, treatments and prophylaxes. In particular, expectations of monoclonal antibodies as medicines for treatments and prophylaxes are increasing. Above all, their application to human bodies is expected to be developed further more in future, and development of human-derived monoclonal antibodies which are favorable in point of antigenicity is being advanced.

Hitherto, in this technical field, polyclonal antibodies such as immunoglobulins have been used for the same purpose for medical diagnosis and treatment. While a monoclonal antibody is a homogeneous one having reactivity to only a specific epitope, a polyclonal antibody is a mixture of plural antibodies as is named so. Therefore, in a polyclonal antibody, plural molecules each having different properties act to mutually stabilize them so that such a polyclonal antibody is, as a whole, in a relatively stable state. However, in a purified monoclonal antibody, stabilization by the interaction between different molecules could not be expected so that such a monoclonal antibody is unstable to various physical and chemical actions irrespective of the globulin class of itself.

Globulin proteins such as monoclonal antibodies and polyclonal antibodies are often heated for the purpose of inactivating viruses therein, especially when they are used for medical diagnosis and treatment. Such globulin proteins are unsuitable to storage in the solutions for a long period of time. Therefore, employment of freeze-drying formulation has been common for a stable storage of such globulin protein molecules. In addition, the globulin proteins are often treated with acids or alkali substances, if desired.

To such heat-treatment, freeze-drying and acid- or alkali-treatment, polyclonal antibodies are generally stable, but monoclonal antibodies would often be denatured and easily lose their activity by such treatment. In particular, IgM is less stable than any other monoclonal antibodies of other globulin classes (e.g., IgG, IgA and IgE). Regarding heat-treatment of antibodies, for example, JP-A 61-76423 (the term "JP-A" means an "unexamined published Japanese patent application") discloses the fact that monoclonal antibodies are unstable to heat-treatment and that, for the purpose of overcoming the thermal instability, a hydrolysate of ovalbumin is added to a monoclonal antibody preparation.

On the other hand, freeze-drying treatment involves a problem specific to monoclonal antibodies. Namely, in freeze-drying a monoclonal antibody, if a monoclonal antibody solution is freeze-dried without adding a stabilizer thereto, there occurs a problem of decrease of the antigen-binding activity of the monoclonal antibody due to denaturation of itself during freeze-drying. Therefore, it is necessary to prevent this problem. The problem is noticeable in freeze-drying a monoclonal antibody, while it is not so significant in freeze-drying a polyclonal antibody as a polyclonal antibody is stable because of the above-mentioned reasons.

In preparing a freeze-dried product of a monoclonal antibody, addition of albumin of a heterologous protein to a solution of a monoclonal antibody before freeze-drying (for example, JP-A 60-146833, 61-78730 and 61-78731, and WO 90/11091) or addition of maltose of a saccharide thereto (for example, WO 89/11297) is known.

Immunoglobulins of polyclonal antibodies are usually used at a relatively low concentration, and aggregates would often form in the solutions during storage or during the succeeding freeze-drying treatment. The aggregates are considered to cause a serious anaphylactoid side effect, when the globulin containing them is intravenously injected to human bodies. Therefore, for the purpose of preventing formation of such aggregates, addition of a heterologous protein to the stock solutions is known. For instance, addition of gelatin alone of a heterologous protein to an immunoglobulin solution (for example, JP-A 58-167518, Vox. Sang. (1983) 51, 81-86) or addition of both sucrose of a saccharide and gelatin thereto is known to be effective for preventing formation of aggregates in the stock solutions and also for maintaining antibacterial and antiviral activities (SU 700132). All the technologies as disclosed above are to prevent formation of aggregates in a high concentration solution of an immunoglobulin of a polyclonal antibody. None of them mention or discuss the matter of decrease of the antigen-binding activity of polyclonal antibodies due to freeze-drying treatment. On the other hand, a monoclonal antibody is stored or freeze-dried in the form having a relatively low concentration. Even under such a low concentration, however, there

is still a problem of denaturation of a monoclonal antibody during freeze-drying as well as a problem of decrease of its antigen-binding activity. The matter has not heretofore been identified as to whether or not addition of gelatin used to prevent formation of aggregates of immunoglobulins would be useful for solving this problem.

5 On the other hand, it is widely known that carboxylic acids and their salts are used as a component of buffers for pH maintenance of various protein solutions. For instance, WO 89/11298 discloses addition of maltose, sodium chloride or sodium phosphate, as a stabilizer, to a stock solution of a monoclonal antibody for the purpose of preventing formation of aggregates to precipitate in the solution. It also mentions use of sodium citrate, in addition to sodium phosphate, as a component of the buffer. However, it merely indicates
10 a technology of preventing formation of aggregates in a stock solution of a monoclonal antibody during storage, but it does not disclose at all a treatment for freeze-drying a monoclonal antibody, a treatment for preventing denaturation of a monoclonal antibody during freeze-drying it and also a treatment for preventing decrease of the antigen-binding activity thereof. WO 89/11297 discloses a technology of adding maltose, as a stabilizer, to a monoclonal IgG antibody solution to be freeze-dried and further adding, as a buffer
15 component, of 5 to 10 mM sodium acetate thereto so that the pH value of the solution is kept to fall within an acidic range of being from 3 to 6. In this case, sodium acetate is obviously used as a component of a buffer solution. WO 89/11297 suggests nothing as to the fact that carboxylic acid or its salt would still act as a stabilizer for preventing denaturation of antibody during freeze-drying treatment thereof in the pH range where the carboxylic acid or its salt does not have their buffer action. Regarding a pH range of an antibody
20 solution, if an antibody solution having a low pH value is intravenously injected as an injection to a body, it would often have a pain in the injected part thereby. Where an antibody solution is used as an injection, it is desirable to have a pH value in an approximately neutral pH range. However, utilization of such a use of an antibody solution in a neutral pH range is not suggested in WO 89/11297.

For the purpose of inactivating viruses which would contaminate immunoglobulins in preparing them
25 from sera or plasma, immunoglobulins are often heated in the form of their solutions. For instance, JP-A 62-292731, 61-194035, 61-191622 and 57-140724 disclose addition of carboxylic acids to said globulin solutions for this purpose. JP-A 61-78730 and 61-78731 disclose addition of sodium acetate to immunoglobulins and heating them in a dry state. However, all of them merely mention addition of carboxylic acids for the purpose of stabilizing immunoglobulins in the heat-treatment. It has not heretofore been known
30 whether or not carboxylic acids and their salts would be useful for preventing denaturation of antibodies during freeze-drying of them and also for preventing decrease of an antigen-binding activity owing to said denaturation.

PROBLEM TO BE SOLVED BY THE INVENTION

35 The object of the present invention is to provide stable freeze-dried preparations of monoclonal antibodies, which are free from denaturation of the monoclonal antibodies during freeze-drying of them and from decrease of their antigen-binding activity owing to said denaturation.

MEANS FOR SOLVING THE PROBLEM

The present inventors earnestly studied for the purpose of solving the above-mentioned problem and, as a result, have found that gelatin, carboxylic acids or their salts are effective for stabilizing a monoclonal antibody in freeze-drying it. Namely, they have found that, by addition of gelatin to a solution containing a
45 monoclonal antibody to be freeze-dried, denaturation of the monoclonal antibody during freeze-drying it as well as decrease of its antigen-binding activity may be prevented and that, by addition of carboxylic acid or its salt to a solution containing a monoclonal antibody to be freeze-dried, denaturation of the monoclonal antibody during freeze-drying it as well as decrease of its antigen-binding activity owing to said denaturation may be prevented in a broad pH range and even at a pH value being outside the range where a buffer
50 action is exhibited. On the basis of these observations, they have found that it is possible to prepare a stable and highly safe preparation composition of a monoclonal antibody, and have completed the present invention.

Specifically, the present invention provides a freeze-dried preparation containing a monoclonal antibody and gelatin as well as a preparation as prepared by freeze-drying a solution containing a monoclonal
55 antibody and carboxylic acid or its salt and having pH between 6.1 and 8.1.

Next, the present invention will be explained concretely hereunder.

The monoclonal antibody to be used in the present invention is any and every monoclonal antibody that is generally obtained from human beings, mice, rats and others, and the origins and the producing means

are not specifically defined. For instance, the monoclonal antibody for use in the present invention may be obtained from a culture medium as obtained by cultivating antibody-producing cells as prepared by known methods such as cell fusion method or transformation method, or by cultivating cells into which a cloned antibody gene has been incorporated, or from ascites, etc. of a mouse into which such antibody-producing cells have been transplanted. For purifying the monoclonal antibody obtained from such a cell culture medium or mouse ascites or the like, usable are various purification methods such as ammonium sulfate salting-out, ion exchange chromatography, gel filtration, affinity chromatography, ultra-centrifugation, adsorption chromatography and hydrophobic chromatography. The globulin classes of the monoclonal antibody to be used in the present invention are mostly IgG, IgM, IgA and IgE, but they are not specifically defined. A monoclonal antibody of any globulin class can be used in the present invention. Above all, IgM is less stable than those of other globulin classes. Therefore, the stabilizing method effective to IgM class monoclonal antibody may easily be applied to monoclonal antibodies of other globulin classes. In the present invention, a single monoclonal antibody may be used or plural monoclonal antibodies may be also used as a mixture of them with no problem.

Gelatin may be grouped into two types (neutral type and acidic type) according to the methods of preparing it, of which the isoelectric points are different from each other. Both of them may be used in the present invention. In addition, chemically modified gelatins such as oxypolygelatin or modified liquid gelatins may be also used.

As carboxylic acid, usable are, for example, citric acid, acetic acid, oxalic acid, succinic acid and fumaric acid. Citric acid is preferable. As salt of carboxylic acid, usable are, for example, sodium citrate, potassium citrate, sodium acetate, potassium acetate, sodium oxalate, potassium oxalate, sodium succinate, potassium succinate, sodium fumarate and potassium fumarate. Sodium citrate is preferable.

For the purpose of stabilizing the monoclonal antibody or for the purpose of pH adjusting, isotonicating and buffering the monoclonal antibody-containing solution to be freeze-dried, inorganic salt, monosaccharide, disaccharide, sugar alcohol or amino acid may be further added, in addition to gelatin or carboxylic acid or its salt.

As inorganic salt, usable are, for example, sodium chloride, potassium chloride and magnesium chloride. Sodium chloride is preferable.

As monosaccharide, usable are, for example, glucose, mannose, galactose and fructose. Glucose or mannose is preferable.

As disaccharide, usable are, for example, maltose, sucrose and lactose. Maltose or sucrose is preferable.

As sugar alcohol, usable are, for example, sorbitol and mannitol. Mannitol is preferable.

As amino acid, usable are, for example, glycine, alanine, valine, leucine, isoleucine, tyrosine, phenylalanine, serine, threonine, glutamine, glutamic acid, asparagine, aspartic acid, arginine, lysine, histidine, proline, tryptophan, methionine and cysteine. Glycine or arginine is preferable.

For producing the freeze-dried preparation of the present invention, a monoclonal antibody solution containing gelatin or carboxylic acid or its salt may be freeze-dried. Preferably, a monoclonal antibody solution is added to a buffer containing gelatin or carboxylic acid or its salt and having an adjusted pH value; or gelatin or carboxylic acid or its salt is added to a monoclonal antibody-containing solution. The concentration of the monoclonal antibody in the solution to be used in the present invention is from 0.01 mg/ml to 50 mg/ml, preferably from 0.1 mg/ml to 10 mg/ml. The addition amount of gelatin is from 1/100 to 100 parts by weight to one part by weight of the monoclonal antibody. Preferably, it is from 1/10 to 10 parts by weight to one part by weight of the same. The concentration of carboxylic acid or its salt to be added is from 2 mM to 500 mM, preferably from 10 mM to 200 mM.

The pH value of the solution of dissolving the monoclonal antibody to be freeze-dried is from 4.0 to 8.1 when gelatin is added thereto; or it is from 6.1 to 8.1, preferably from 6.5 to 7.8, when carboxylic acid is added or both gelatin and carboxylic acid are added. Adjustment of the pH value of the solution may be done by use of organic acids, inorganic acids, inorganic salts or other compounds which are generally used for pH adjustment, singly or in combination of two or more of them. As compound usable for such pH adjustment, there are mentioned, for example, citric acid, sodium citrate, potassium citrate, phosphoric acid, sodium phosphate, potassium phosphate, hydrochloric acid, tris(hydroxymethyl)aminomethane, acetic acid, sodium acetate, potassium acetate, sodium hydroxide, boric acid, sodium borate, and potassium borate. The concentration of the buffer of dissolving the monoclonal antibody is from 5 mM to 500 mM, preferably from 10 mM to 500 mM. As mentioned above, carboxylic acid or its salt may be also used for pH adjustment of a monoclonal antibody containing solution, and the above-mentioned amount of the acid or its salt indicates all the amount thereof in the solution including one for pH adjustment.

The thus prepared monoclonal antibody solution may be well stable when freeze-dried directly as it is. It is also possible to add thereto a surfactant such as Tween 20 or Tween 80, a human or bovine albumin, or a chelating agent such as EDTA, for the purpose of isotonicating the solution or of preventing adhesion of the monoclonal antibody to the container containing the solution.

- 5 Freeze-drying of the monoclonal antibody solution may be carried out by any ordinary known method, and the drying temperature and the vacuum degree in the method may be selected suitably.

EXAMPLES

- 10 Next, the present invention will be explained by way of the following examples, which are, however, not limitative. IgM is exemplified herein as a monoclonal antibody in the present invention. This is because, as mentioned above, IgM is less stable than antibodies of other globulin classes (e.g., IgG, IgA and IgE), and therefore the stabilizing effect to be verified in IgM may be easily applied to antibodies of other globulin classes.

- 15 Example 1:

- Cells of Epstein-Barr virus (EB virus) transformed cell line MP-5038 (FERM BP-1596) reactive to Group E serotype *Pseudomonas aeruginosa* were cultured, and a human monoclonal antibody was purified from the culture supernatant by ammonium sulfate salting-out, gel filtration with Sephacryl S-300 (Pharmacia Co.) and column chromatography with a hydroxyapatite HPLC column (Mitsui Toatsu Chemicals, Inc.) and Blue-Sepharose (Pharmacia Co.). The monoclonal antibody as obtained by these methods had a purity of 99% or higher, as analyzed by SDS-electrophoresis and HPLC with a gel filtration column. The monoclonal antibody was dissolved in a phosphate-buffered physiological saline having an adjusted pH value of 7.4 (hereinafter referred to as PBS), to have a final concentration thereof of being 0.1 mg/ml. On the other hand, gelatin (high-grade gelatin; Nippi Co., type A (neutral gelatin) and type B (acidic gelatin)) was added thereto to have a final concentration thereof of being from 0.001 to 1%. The resulting solution was then put in 2 ml-volume polypropylene cryotubes (Corning Co.) under a sterilized condition, each in an amount of 0.5 ml, and frozen therein at -80°C. These were freeze-dried in vacuo. After dried, the same amount, as that before freeze-drying, of a distilled water for injection was added to the freeze-dried product so that the product was dissolved. The antigen-binding activity of the monoclonal antibody in the resulting solution was measured by the method mentioned below.

(Method of Measuring Antigen-Binding Activity)

- 35 Measurement of the antigen-binding activity of the anti-*Pseudomonas aeruginosa* antibody was carried in the manner mentioned below. A lipopolysaccharide (LPS), as prepared from formalin-killed cells of Group E serotype *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27581 by Tanabe et al's method (Menekijikkensousahou C, (1978) 1793-1801), was dissolved in PBS to have a concentration of 1 mg/ml, and this was diluted by 500-fold with 0.1 M phosphate buffer (pH 7.0). The thus diluted solution was then put in wells of a 96-well EIA plate (Immulon-600; Greiner Co.) in an amount of 50 µl/well. The plate was allowed to stand at 4°C overnight for coating, and it was then washed with PBS containing 0.05% Tween 20 (hereinafter referred to as a "washing solution"). A PBS containing 0.5% bovine serum albumin (hereinafter referred to as a "blocking solution") was added to each well in an amount of 200 µl/well, and the plate was then shaken at room temperature for one hour so that the non-specific protein-binding sites were saturated. After the blocking solution was removed, solutions of a sample to be tested, each having a multi-fold diluted concentration in order from a determined concentration, were put in the wells each in an amount of 100 µl/well, and the plate was then shaken for 2 hours at room temperature. After washed with the washing solution four times, a peroxidase-labeled goat anti-human IgM antibody (Tago Co.) was diluted by 1000-fold with the blocking solution, and was put in each well in an amount of 100 µl/well and the plate was shaken at room temperature for 2 hours. After washed with the washing solution four times and then with 0.1 M citric acid buffer (pH 4.0) one time, a substrate solution containing 1 mg/ml of 2,2'-azinobis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) and 0.003% hydrogen peroxide in the same buffer was put into each well in an amount of 50 µl/well, and the plate was then shaken at room temperature. After 30 minutes, 2% succinic acid was added to each well in an amount of 50 µl/well so that the enzymatic reaction therein was stopped. The absorbance at 414 nm was measured with a 96-well plate reader (Nippon InterMed Co.). Double logarithmic plotting was done between the reciprocal of the diluting magnification and the absorbance, and the diluting magnification to show the absorbance of being 0.1 was obtained and indicated as

the antigen-binding activity of the sample tested.

The results are shown in Table 1, as a relative activity on the basis of the antigen-binding activity of the sample before frozen of being 10. Where a monoclonal antibody was freeze-dried without addition of gelatin thereto, the antigen-binding activity noticeably decreased. As opposed to the case, when gelatin was added, the antigen-binding activity was well recovered even in the freeze-dried product, and the effect depended upon the concentration of the gelatin added.

Table 1

Gelatin Concentration (%)	Antigen-Binding Activity	
	Neutral Gelatin	Acidic Gelatin
0	2	2
0.001	4	3
0.003	6	6
0.01	10	8
0.03	10	10
0.1	10	10
1	10	10

Example 2:

The same monoclonal antibody as that used in Example 1 was dissolved in various buffers each having a different pH value to each have a final concentration of 0.1 mg/ml. On the other hand, a neutral gelatin was added to them to each have a final concentration of 0.01%. Each of them was put in polypropylene cryotubes each in an amount of 0.5 ml under a sterilized condition and frozen at -80°C. These were then freeze-dried in vacuo. The same amount, as that before freeze-drying, of a distilled water for injection was added to the freeze-dried product so that the product was dissolved, and the antigen-binding activity of the monoclonal antibody in the resulting solution was measured.

The results obtained are shown in Table 2, as a relative activity based on the activity of the sample before frozen of being 10. At every pH condition, the antigen-binding activity was well recovered.

Table 2

Buffer (0.2 M)	pH	Gelatin Concentration (%)	Antigen-Binding Activity
Sodium Citrate	4.0	0.01	10
	5.0	0.01	10
	6.0	0.01	10
Sodium Phosphate	6.2	0.01	10
	7.0	0.01	10
	8.1	0.01	10

Example 3:

0.1 mg/ml, as a final concentration, of the same monoclonal antibody as that used in Example 1 was dissolved in 20 mM phosphate buffer (pH 7) not containing or containing 2 or 10 mM sodium citrate, whereupon the salt concentration of the resulting solution was adjusted to be 150 mM with sodium chloride. The monoclonal antibody solution was then put in polypropylene cryotubes under a sterilized condition, each in an amount of 0.5 ml, and frozen therein at -80°C. These were freeze-dried in vacuo. The same amount, as that before freeze-drying, of a distilled water for injection was added to the freeze-dried product so that the product was dissolved. The antigen-binding activity of the monoclonal antibody in the resulting solution was measured.

The results obtained are shown in Table 3, as a relative activity based on the activity of the sample before frozen of being 10. Where the monoclonal antibody was freeze-dried in the absence of sodium citrate, the antigen-binding activity of the freeze-dried monoclonal antibody noticeably decreased. As opposed to the case, when the monoclonal antibody was freeze-dried in the presence of sodium citrate, then the antigen-binding activity of the freeze-dried monoclonal antibody was well recovered, depending upon the concentration of the sodium citrate as added.

Table 3

Sodium Citrate Concentration (mM)	0	2	10
Antigen-Binding Activity	2	5	9

Example 4:

0.1 mg/ml, as a final concentration, of the same monoclonal antibody as that used in Example 1 was dissolved in 50 mM phosphate buffer (pH 6.1 to 8.1) containing sodium citrate in a concentration of from 10 mM to 200 mM, whereupon sodium chloride was added thereto, if necessary, so that the salt concentration of the resulting solution became 150 mM. The resulting monoclonal antibody solution was then put in polypropylene cryotubes under a sterilized condition, each in an amount of 0.5 ml, and frozen therein at -80°C. These were freeze-dried in vacuo. The same amount, as that before freeze-drying, of a distilled water for injection was added to the freeze-dried product so that the product was dissolved. The antigen-binding activity of the monoclonal antibody in the resulting solution was measured.

The results obtained are shown in Table 4, as a relative activity based on the activity of the sample before frozen of being 10. By adding sodium citrate at pH of from 6.1 to 8.1, the antigen-binding activity of all the freeze-dried products was well recovered.

Table 4

pH of Solution	Antigen Binding Activity Sodium Citrate Concentration (mM)			
	10	50	100	200
6.1	10	10	10	10
7.0	9	10	10	10
8.1	9	10	10	-

Example 5:

0.1 mg/ml, as a final concentration, of the same monoclonal antibody as that used in Example 1 was dissolved in PBS. In addition, 0.003%, as a final concentration, of a neutral gelatin was added thereto, and further glucose, sucrose, mannitol, glycine or arginine was added thereto in an amount, as a final concentration, of from 0.001 to 0.1%. The resulting monoclonal antibody solution was then put in polypropylene cryotubes under a sterilized condition, each in an amount of 0.5 ml, and frozen therein at -80°C. These were freeze-dried in vacuo. The same amount, as that before freeze-drying, of a distilled water for injection was added to the freeze-dried product so that the product was dissolved. The antigen-binding activity of the monoclonal antibody in the resulting solution was measured.

The results obtained are shown in Table 5, as a relative activity based on the activity of the sample before frozen of being 10. The antibody activity was well recovered in all cases of the low molecular substances, depending upon the concentration of them.

Table 5

Concentration of Gelatin(%)	Concentration of Low Molecular Substance (%)	Antigen-Binding Activity				
		glucose	sucrose	mannitol	glycine	arginine
0.003	0.001	7	7	7	8	7
0.003	0.003	8	8	7	8	8
0.003	0.01	8	6	8	10	8
0.003	0.03	8	8	8	10	8
0.003	0.1	8	10	8	10	8
0.003	0	8	6	6	6	6

Example 6:

0.1 mg/ml, as a final concentration, of the same monoclonal antibody as that used in Example 1 was dissolved in PBS. In addition, 0.003%, as a final concentration, of a neutral gelatin was added thereto, and further 0.5 or 1%, as a final concentration, of mannitol was added thereto. The resulting monoclonal antibody solution was then put in polypropylene cryotubes under a sterilized condition, each in an amount of 0.5 ml, and frozen therein at -80°C . These were freeze-dried in vacuo. The same amount, as that before freeze-drying, of a distilled water for injection was added to the freeze-dried product so that the product was dissolved. The antigen-binding activity of the monoclonal antibody in the resulting solution was measured.

The results obtained are shown in Table 6, as a relative activity based on the activity of the sample before frozen of being 10. The antigen-binding activity was well recovered in all the freeze-dried products, each containing a different concentration of mannitol.

Table 6

Concentration of Mannitol (%)	0.5	1.0
Antigen-Binding Activity	10	10

Example 7:

1 mg/ml, as a final concentration, of the same monoclonal antibody as that used in Example 1 was dissolved in 0.1 M phosphate buffer (pH 7.0) containing a neutral gelatin (0.01%), sodium citrate (0.02 M), mannitol (0.5%) and sodium chloride (0.05 M). The resulting monoclonal antibody solution was then put in 10 ml-volume glass vials (Iwaki Glass Co.) under a sterilized condition, each in an amount of 1 ml, and frozen therein at -80°C . These were freeze-dried in vacuo. The same amount, as that before freeze-drying, of a distilled water for injection was added to the freeze-dried product so that the product was dissolved. The antigen-binding activity of the monoclonal antibody in the resulting solution was measured. As a result, the freeze-dried monoclonal antibody products were found to have the same antigen-binding activity as that of the samples before frozen.

Example 8:

1 mg/ml, as a final concentration, of the same monoclonal antibody as that used in Example 1 was dissolved in 0.1 M phosphate buffer (pH 7.0) containing sodium citrate (0.02 M), sodium chloride (0.05 M) and mannitol (0.5%). The resulting monoclonal antibody solution was then put in glass vials and frozen therein at -80°C . These were freeze-dried in vacuo. The same amount, as that before freeze-drying, of a distilled water for injection was added to the freeze-dried product so that the product was dissolved. The antigen-binding activity of the monoclonal antibody in the resulting solution was measured in the same manner as in Example 1. As a result, the freeze-dried monoclonal antibody products were found to have the same antigen-binding activity as that of the samples before frozen.

Example 9:

Cells of human-human hybridoma MP5121 (FERM BP-2270) producing a human IgM reactive to Group A serotype Pseudomonas aeruginosa, which had been produced by cell fusion, were cultured, and the monoclonal antibody was purified from the culture supernatant in the same manner as in Example 1. The monoclonal antibody was dissolved in 0.1 M phosphate buffer (pH 7.0) containing sodium citrate (0.02 M), sodium chloride (0.05 M) and mannitol (0.5%), to have a final concentration thereof of being 1 mg/ml. The resulting monoclonal antibody solution was then put in glass vials and frozen therein at -80°C. These were freeze-dried in vacuo. The same amount, as that before freeze-drying, of a distilled water for injection was added to the freeze-dried product so that the product was dissolved. The antigen-binding activity of the monoclonal antibody in the resulting solution was measured in the same manner as in Example 1, provided that the antigen LPS was extracted from Group A serotype Pseudomonas aeruginosa (ATCC 27577). As a result, the freeze-dried monoclonal antibody products were found to have the same antigen-binding activity as that of the samples before frozen.

Example 10:

Monoclonal antibodies were purified from culture supernatants of cells of human IgM-producing human-human hybridoma MP5097, MP5139, MP5114 and MP5156 (FERM BP-2268, 2272, 2269 2339, respectively), all of which had been produced by cell fusion. These monoclonal antibodies had reactivity with Pseudomonas aeruginosa and were reactive to Groups B, E, G and I serotypes Pseudomonas aeruginosa, respectively. Five kinds of monoclonal antibodies comprising 4 kinds of these monoclonal antibodies and the monoclonal antibody used in Example 9 were dissolved in 0.1 M phosphate buffer (pH 7.0) containing sodium citrate (0.02 M), sodium chloride (0.05 M) and mannitol (0.5%), each in an amount, as a final concentration, of 5 mg/ml. These monoclonal antibody solutions were put in glass vials and frozen therein at -80°C. These were freeze-dried in vacuo. The same amount, as that before freeze-drying, of a distilled water for injection was added to each of the freeze-dried products so that each product was dissolved. The antigen-binding activity of each of the monoclonal antibodies in the resulting solutions was measured in the same manner as in Example 1, provided that as the antigen to each antibody, used were LPSs as extracted from ATCC 27577 (to Group A serotype), ATCC 27578 (to Group B serotype), ATCC 27581 (to Group E serotype), ATCC 27584 (to Group G serotype) and ATCC 27586 (to Group I serotype), respectively. As a result, the freeze-dried monoclonal antibody products were found to have the same antigen-binding activity to the five Pseudomonas aeruginosa LPSs of different serotypes, respectively, as that of the samples before frozen.

ADVANTAGE OF THE INVENTION

In accordance with the present invention characterized by addition of gelatin or carboxylic acid or its salt to a monoclonal antibody-containing solution to be freeze-dried, denaturation of a monoclonal antibody during freeze-drying can be well prevented so that a monoclonal antibody-containing freeze-dried preparation having a stable antigen-binding activity can be provided. The present invention may be applied to a monoclonal antibody of any globulin class, including IgG, IgM, IgA and IgE. Especially, it can be sufficiently applied to unstable IgM. The present invention may be well applied to any of human-derived, mouse-derived and rat-derived monoclonal antibodies. The number of the kinds of the monoclonal antibodies to be contained in the freeze-dried preparation of the present invention may be one or more.

The monoclonal antibody-containing freeze-dried preparation of the present invention may be used, like other immunoglobulin preparations, as an adjuvant for immunoauxotherapy for prophylaxis and treatment of bacterial infectious diseases and viral infectious diseases.

Claims

1. A freeze-dried preparation comprising a monoclonal antibody and gelatin.
2. A preparation which is prepared by freeze-drying a solution comprising a monoclonal antibody and carboxylic acid or its salt and having pH of from 6.1 to 8.1.
3. The preparation as claimed in claim 2, in which the carboxylic acid is citric acid.

4. The preparation as claimed in claim 1, which is obtained by freeze-drying a solution having pH of from 4.0 to 8.1.
- 5 5. The preparation as claimed in anyone of claims 1 to 4, in which the monoclonal antibody is a human-derived one.
6. The preparation as claimed in anyone of claims 1 to 4, in which the monoclonal antibody is one having a globulin class of IgM.
- 10 7. The preparation as claimed in claim 1 or 4, in which the gelatin is a neutral gelatin or an acidic gelatin.
8. The preparation as claimed in claim 1 or 4, which further contains carboxylic acid or its salt or an inorganic salt.
- 15 9. The preparation as claimed in anyone of claims 1 to 4, which further contains at least one of monosaccharide, disaccharide, sugar alcohol and amino acid.
10. The preparation as claimed in anyone of claims 1 to 4, which contains plural monoclonal antibodies.

20

25

30

35

40

45

50

55

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No. PCT/JP92/00226

I. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER (If several classification symbols apply, indicate all) ⁶		
According to International Patent Classification (IPC) or to both National Classification and IPC		
Int. Cl. ⁵ A61K39/395		
II. FIELDS SEARCHED		
Minimum Documentation Searched ⁷		
Classification System	Classification Symbols	
IPC	A61K39/395	
Documentation Searched other than Minimum Documentation to the Extent that such Documents are Included in the Fields Searched ⁸		
III. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT ⁹		
Category ¹⁰	Citation of Document, ¹¹ with Indication, where appropriate, of the relevant passages ¹²	Relevant to Claim No. ¹³
Y	JP, A, 58-167518 (Nippon Sekijuji-sha), October 3, 1983 (03. 10. 83), (Family: none)	1, 4-10
Y	JP, A, 60-146833 (The Green Cross Corp.), August 2, 1985 (02. 08. 85), (Family: none)	1, 4-10
<p>¹⁰ Special categories of cited documents:</p> <p>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>"E" earlier document but published on or after the international filing date</p> <p>"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)</p> <p>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p> <p>"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention</p> <p>"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step</p> <p>"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art</p> <p>"A" document member of the same patent family</p>		
IV. CERTIFICATION		
Date of the Actual Completion of the International Search	Date of Mailing of this International Search Report	
April 28, 1992 (28. 04. 92)	May 19, 1992 (19. 05. 92)	
International Searching Authority	Signature of Authorized Officer	
Japanese Patent Office		